

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2404120

论著·实验研究

活性氧簇/沉默信息调节因子1在高氧致 支气管上皮细胞损伤中的作用

杨坤 吴越 章容 雷小平 康兰 董文斌

(西南医科大学附属医院儿童医学中心新生儿科/四川省出生缺陷临床医学研究中心, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) /沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1) 对高氧致BEAS-2B细胞线粒体损伤的影响。**方法** 实验分为三部分: (1) 细胞分为高氧0 h (H0) 组、H6组、H12组、H24组、H48组。(2) 细胞分为对照组、H48组、高氧48 h+SIRT1抑制剂 (H48+EX 527) 组和高氧48 h+SIRT1激动剂 (H48+SRT1720) 组。(3) 细胞分为对照组、高氧48 h+乙酰半胱氨酸 (H48+NAC) 组和H48组。采用活性氧试剂盒检测ROS水平, Western blot法检测SIRT1和线粒体相关蛋白表达水平, 免疫荧光染色法检测线粒体相关蛋白表达, 透射电镜检测线粒体形态。**结果** (1) 与H0组相比, H6组、H12组、H24组和H48组ROS荧光强度增加 ($P<0.05$), H48组SIRT1和线粒体相关蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), H24组和H48组线粒体相关蛋白荧光强度降低 ($P<0.05$)。 (2) 与H48组相比, H48+SRT1720组线粒体相关蛋白表达水平升高, 线粒体平均长宽比增加 ($P<0.05$); H48+EX 527组线粒体平均面积减少 ($P<0.05$)。 (3) 与H48组相比, H48+NAC组ROS荧光强度降低, SIRT1和线粒体相关蛋白表达水平升高, 线粒体平均面积和平均长宽比增加 ($P<0.05$)。**结论** ROS/SIRT1轴参与了高氧诱导的BEAS-2B细胞线粒体损伤。

[中国当代儿科杂志, 2024, 26 (8): 852-860]

[关键词] 线粒体损伤; 高氧; 活性氧簇; 沉默信息调节因子1; 人支气管上皮细胞

Role of reactive oxygen species/silent information regulator 1 in hyperoxia-induced bronchial epithelial cell injury

YANG Kun, WU Yue, ZHANG Rong, LEI Xiao-Ping, KANG Lan, DONG Wen-Bin. Department of Neonatology, Children's Medical Center, Affiliated Hospital of Southwest Medical University/Sichuan Clinical Research Center for Birth Defects, Luzhou, Sichuan 646000, China (Dong W-B, Email: dongwenbin2000@163.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of reactive oxygen species (ROS)/silent information regulator 1 (SIRT1) on hyperoxia-induced mitochondrial injury in BEAS-2B cells. **Methods** The experiment was divided into three parts. In the first part, cells were divided into H0, H6, H12, H24, and H48 groups. In the second part, cells were divided into control group, H48 group, H48 hyperoxia+SIRT1 inhibitor group (H48+EX 527 group), and H48 hyperoxia+SIRT1 agonist group (H48+SRT1720 group). In the third part, cells were divided into control group, 48-hour hyperoxia+N-acetylcysteine group (H48+NAC group), and H48 group. The ROS kit was used to measure the level of ROS. Western blot and immunofluorescent staining were used to measure the expression levels of SIRT1 and mitochondria-related proteins. Transmission electron microscopy was used to observe the morphology of mitochondria. **Results** Compared with the H0 group, the H6, H12, H24, and H48 groups had a significantly increased fluorescence intensity of ROS ($P<0.05$), the H48 group had significant reductions in the expression levels of SIRT1 protein and mitochondria-related proteins ($P<0.05$), and the H24 and H48 groups had a significant reduction in the fluorescence intensity of mitochondria-related proteins ($P<0.05$). Compared with the H48 group, the H48+SRT1720 group had significant increases in the expression levels of mitochondria-related proteins and the mitochondrial aspect ratio ($P<0.05$), and the H48+EX 527

[收稿日期] 2024-04-17; [接受日期] 2024-07-08

[基金项目] 四川省科技计划重点研发项目 (2022YFS0062)。

[作者简介] 杨坤, 男, 博士研究生, 主治医师。

[通信作者] 董文斌, 男, 主任医师。Email: dongwenbin2000@163.com。

group had a significant reduction in the mitochondrial area ($P<0.05$). Compared with the H48 group, the H48+NAC group had a significantly decreased fluorescence intensity of ROS ($P<0.05$) and significantly increased levels of SIRT1 protein, mitochondria-related proteins, mitochondrial area, and mitochondrial aspect ratio ($P<0.05$). **Conclusions** The ROS/SIRT1 axis is involved in hyperoxia-induced mitochondrial injury in BEAS-2B cells.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2024, 26(8): 852-860]

Key words: Mitochondrial injury; Hyperoxia; Reactive oxygen species; Silent information regulator 1; Human bronchial epithelial cell

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是常见的早产儿肺疾病, 以肺泡和肺血管发育障碍为主要病理特征^[1-2], 其发病机制复杂, 危险因素及不良结局多^[3-4]。高氧诱导的氧化应激是 BPD 的关键驱动因素^[5]。研究表明在生命早期累积氧暴露的增加与 BPD 的发病率呈正相关^[6]。从机制上讲, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的高度不稳定性很容易导致糖、脂质、蛋白质和核酸过氧化, 从而对细胞和组织造成损伤^[7]。

泛醇-细胞色素 c 还原酶复合体核心蛋白 2 (ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein 2, UQCRC2) 是线粒体复合体 III 的亚基, 柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS) 是三羧酸循环的关键酶, 二者反映了线粒体能量代谢状态。研究发现线粒体生物能量学失效是 BPD 的一个重要环节^[8]。核呼吸因子 2 (nuclear respiratory factor 2, Nrf2) 通过调节线粒体生物发生在 BPD 中也发挥关键作用^[9]。此外, 线粒体分裂对于维持线粒体数量和形态完整性至关重要。它是指一个线粒体在动力相关蛋白 1 (dynammin-related protein 1, DRP1)、线粒体裂变蛋白 1 (mitochondrial fission protein 1, FIS1)、线粒体分裂因子 (mitochondrial fission factor, MFF) 的介导下分裂成两个线粒体的过程^[10]。总的来说, UQCRC2、CS、Nrf2、DRP1、FIS1 和 MFF 表达变化反映了线粒体生物能量学、生物发生及动力学的改变。

沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 是第一个在哺乳动物中发现的 sirtuins 成员, 具有抗氧化和抗炎特性^[11]。本课题组前期证实早产儿在经历高氧暴露后, 外周血单个核细胞中 SIRT1 的核水平降低和核质穿梭增加^[12], 提示 SIRT1 是 BPD 的一个重要调控因子。然而, SIRT1 是否可以调控高氧诱导的线粒体损伤及其是否受到 ROS 的调节尚不清楚。因此, 本研究提出高氧诱导 ROS 的产生抑制 SIRT1, 从而导致线粒体损伤, 其可能参与了 BPD 发病机制的假说。为验证该假说, 本研究以人支气管上皮细胞 BEAS-

2B 为研究对象, 通过建立细胞损伤模型, 探讨 ROS/SIRT1 信号通路在高氧诱导的 BEAS-2B 细胞损伤中的作用, 为 BPD 的发病机制和潜在治疗靶点提供新的视野。

1 材料与方法

1.1 材料

BEAS-2B 细胞购自北纳创联生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基和胎牛血清购自德国 VivaCell 公司; SIRT1 抑制剂 Selisistat (EX 527) 和 SIRT1 激动剂 SRT1720 HCl (SRT1720) 购自美国 Selleck 公司; 乙酰半胱氨酸 (N-Acetylcysteine, NAC) 购自美国 MedChemExpress 公司; 封闭用正常山羊血清、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; TRITC 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 和 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; SIRT1 和 Nrf2 抗体购自英国 Abcam 公司; CS 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; DRP1、MFF、FIS1 和 UQCRC2 抗体购自中国武汉三鹰公司; β -actin 抗体购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 4% 多聚甲醛、胰蛋白酶、RIPA 裂解液、抗体稀释液、脱脂奶粉、活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。

1.2 实验分组

参照本课题组前期方法建立高氧诱导的 BEAS-2B 细胞损伤模型^[13]。本实验分为三部分: (1) 细胞分为高氧 0 h (H0) 组、H6 组、H12 组、H24 组、H48 组。观察不同时间点高氧对 ROS 水平、SIRT1 及线粒体功能的影响。(2) 细胞分为对照组、H48 组、高氧 48 h+SIRT1 抑制剂 (H48+EX 527) 组和高氧 48 h+SIRT1 激动剂 (H48+SRT1720) 组。观察 SIRT1 在高氧诱导的细胞损伤中的作用。(3) 细胞分为对照组、高氧 48 h+乙酰半胱氨酸 (H48+NAC)、H48 组。观察 ROS 对高氧诱导的细胞损伤的影响。

1.3 活性氧检测试剂盒检测 ROS 水平

将细胞种板于 24 孔板中，贴壁 24 h 后经不同条件处理。在避光条件下用无血清培养基将 DCFH-DA 荧光探针稀释 1 000 倍。PBS 清洗 2 次，加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA，于 37℃ 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清培养基清洗各组细胞 3 次。在荧光显微镜下观察并采集图像，每组选取 5 个视野，用 Image J 软件测量平均荧光强度。实验独立重复 3 次。

1.4 免疫荧光染色检测 MFF、FIS1、CS 和 UQCRC2 表达

细胞接种于 24 孔板中经不同条件处理。PBS 清洗 2 次，4% 多聚甲醛固定 15 min。PBS 洗涤 3 次，加入 0.5% TritonX-100 通透 10 min。弃 TritonX-100，加入 500 μ L 10% 封闭用正常山羊血清封闭 1 h。弃封闭液，加入 MFF (1:200)、CS (1:100)、UQCRC2 (1:200) 和 FIS (1:200) 一抗，4℃ 孵育过夜。弃一抗，PBS 清洗 3 次。加入二抗 (1:100) 孵育 2 h。弃二抗，PBS 清洗 3 次。滴加抗荧光淬灭封片液。在荧光显微镜下观察并采集图像，每组选取 4~6 个视野，用 Image J 软件测量平均荧光强度。实验独立重复 3 次。

1.5 Western blot 检测 SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS 和 UQCRC2 蛋白表达水平

用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。加入 5 \times 蛋白上样缓冲液变性。配置分离胶和浓缩胶，经上样、电泳分离、转膜，7% 脱脂奶粉封闭 70 min，PBST 洗涤 PVDF 膜 3 次，5 min/次。加入 SIRT1 (1:2 000)、Nrf2 (1:1 000)、DRP1 (1:2 000)、MFF (1:20 000)、FIS (1:3 000)、CS (1:1 000)、UQCRC2 (1:10 000) 和 β -actin (1:5 000) 一抗，4℃ 摇床孵育过夜。次日用 PBST 洗涤 PVDF 膜 3 次，10 min/次。加入二抗 (1:2 000)，室温孵育 70 min。PBST 洗涤 PVDF 膜

3 次，10 min/次。加入 ECL 化学发光液进行显影。用 Image J 软件测量目的蛋白和 β -actin 的灰度值，以目的蛋白和 β -actin 的比值作为目的蛋白的相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.6 透射电镜检测线粒体形态

细胞接种于 10 cm 培养皿中经不同条件处理。PBS 清洗 2 次，室温 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。弃上清，加入 1 mL 含 3% 戊二醛的 PBS 溶液重悬细胞，置于 4℃ 冰箱静置 5 min。转移细胞悬液至 1.5 mL 离心管，4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清，加入 3% 戊二醛固定过夜。1% 四氧化锇固定 2 h，丙酮梯度脱水 (20 min/次)，渗透、包埋，制备 60~90 nm 超薄切片。染色后超纯水清洗 3 次，铜网切片放入铜网盒内室温干燥过夜。使用透射电镜采集图像，每组选取 3 个视野，用 Image Pro Plus 6.0 软件测量线粒体的平均面积和平均长宽比。实验独立重复 3 次。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0、GraphPad Prism、Image Pro Plus 6.0 和 Image J 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较使用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高氧暴露不同时间点各组细胞 ROS 水平比较

与 H0 组 (17.7 ± 1.5) 相比，H6 组 (23.4 ± 1.0)、H12 组 (39.2 ± 3.6)、H24 组 (54.6 ± 2.0)、H48 组 (57.1 ± 0.3) ROS 荧光强度增加 ($P < 0.05$)；H12 组 ROS 荧光强度较 H6 组增加 ($P < 0.001$)；H24 组和 H48 组 ROS 荧光强度较 H12 组增加 ($P < 0.001$)。见图 1。

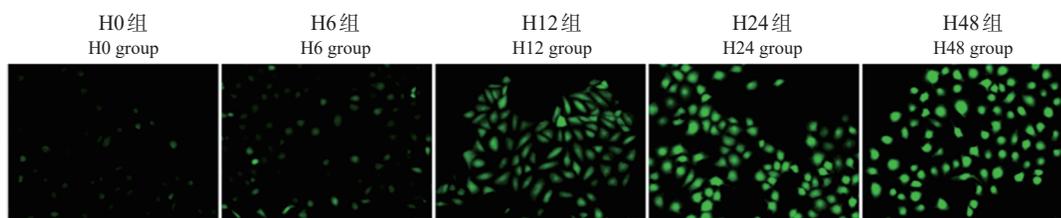


图 1 高氧暴露 0、6、12、24、48 h 时 BEAS-2B 细胞 ROS 水平 (荧光显微镜, $\times 200$) 绿色荧光代表 ROS 水平, 颜色越深代表 ROS 水平越高。H6 组 ROS 水平高于 H0 组, H12 组 ROS 水平高于 H6 组, H24 组和 H48 组 ROS 水平高于 H12 组。

2.2 高氧暴露不同时间点各组细胞SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白表达水平比较

与H0组相比，H48组SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白表达水平均降低 ($P<0.05$)。见图2、表1。

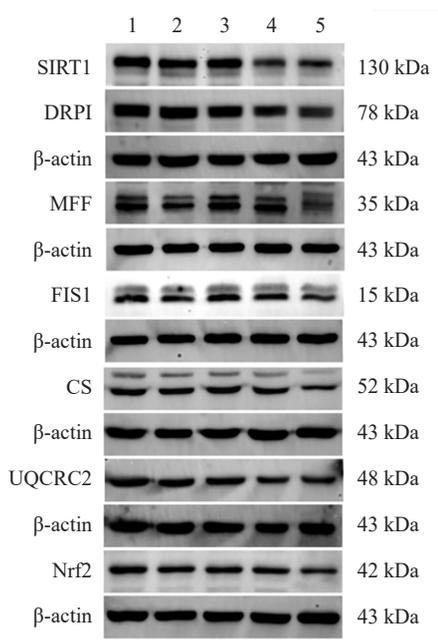


图2 高氧0、6、12、24、48 h时BEAS-2B细胞SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白表达条带图 1: H0组; 2: H6组; 3: H12组; 4: H24组; 5: H48组。

2.3 高氧暴露不同时间点各组细胞MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白表达情况

与H0组相比，H24组和H48组MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白荧光强度均降低 ($P<0.05$)。见

图3、表2。

2.4 SIRT1抑制剂和激动剂干预后各组细胞Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白水平比较

与对照组比较，H48组和H48+EX 527组Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白表达降低 ($P<0.05$)，H48+SRT1720组上述蛋白表达较H48组和H48+EX 527组升高 ($P<0.05$)。见图4、表3。

2.5 SIRT1抑制剂和激动剂干预后各组细胞线粒体形态比较

与对照组 [$(2.42 \pm 0.25) \mu\text{m}^2$] 比较，H48组 [$(1.07 \pm 0.27) \mu\text{m}^2$] 和H48+EX 527组 [$(0.41 \pm 0.11) \mu\text{m}^2$] 线粒体平均面积减少 ($P<0.001$)，并且H48+EX 527组低于H48组 ($P=0.004$)；H48+SRT1720组 [$(0.85 \pm 0.11) \mu\text{m}^2$] 线粒体平均面积高于H48+EX 527组和H48组 ($P<0.05$)。与对照组 (1.83 ± 0.10) 比较，H48组 (1.48 ± 0.04) 和H48+EX 527组 (1.54 ± 0.03) 线粒体平均长宽比降低 ($P<0.001$)；H48+SRT1720组 (1.80 ± 0.02) 线粒体平均长宽比高于H48组和H48+EX 527组 ($P<0.001$)。见图5。

2.6 NAC干预后各组细胞ROS水平比较

与对照组 (5.2 ± 4.8) 比较，H48组 (60.0 ± 2.4) ROS荧光强度增加 ($P<0.001$)；与H48组比较，H48+NAC组 (51.2 ± 1.4) ROS荧光强度降低 ($P=0.015$)。见图6。

2.7 NAC干预后各组细胞SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白水平比较

与对照组比较，H48组SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白表达降低 ($P<0.05$)，而H48+NAC组上述蛋白表达较H48组升高 ($P<0.05$)。见图7、表4。

表1 高氧0、6、12、24、48 h时BEAS-2B细胞SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	SIRT1	Nrf2	DRP1	MFF	FIS1	CS	UQCRC2
H0组	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.25
H6组	0.91 ± 0.11	1.05 ± 0.16	1.02 ± 0.27	0.74 ± 0.06 ^a	0.82 ± 0.06 ^a	0.84 ± 0.09	0.88 ± 0.16
H12组	0.92 ± 0.08	0.90 ± 0.12	1.05 ± 0.14	0.84 ± 0.15	0.84 ± 0.08	0.73 ± 0.21 ^a	0.85 ± 0.21
H24组	0.67 ± 0.16 ^{a,b,c}	0.77 ± 0.07 ^b	0.81 ± 0.06	0.73 ± 0.17 ^a	0.78 ± 0.17 ^a	0.65 ± 0.09 ^a	0.65 ± 0.03 ^a
H48组	0.58 ± 0.03 ^{a,b,c}	0.48 ± 0.19 ^{a,b,c,d}	0.60 ± 0.04 ^{a,b,c}	0.67 ± 0.08 ^a	0.63 ± 0.08 ^{a,b,c}	0.57 ± 0.04 ^{a,b}	0.50 ± 0.03 ^{a,b,c}
F值	6.25	8.08	4.89	3.59	5.73	4.57	4.40
P值	0.009	0.004	0.019	0.046	0.012	0.023	0.026

注：[SIRT1] 沉默信息调节因子1；[Nrf2] 核呼吸因子2；[DRP1] 动力相关蛋白1；[MFF] 线粒体分裂因子；[FIS1] 线粒体裂变蛋白1；[CS] 柠檬酸合酶；[UQCRC2] 泛醇-细胞色素c还原酶复合体核心蛋白2；[H0] 高氧0h；[H6] 高氧6h；[H12] 高氧12h；[H24] 高氧24h；[H48] 高氧48h。a示与H0组比较， $P<0.05$ ；b示与H6组比较， $P<0.05$ ；c示与H12组比较， $P<0.05$ ；d示与H24组比较， $P<0.05$ 。

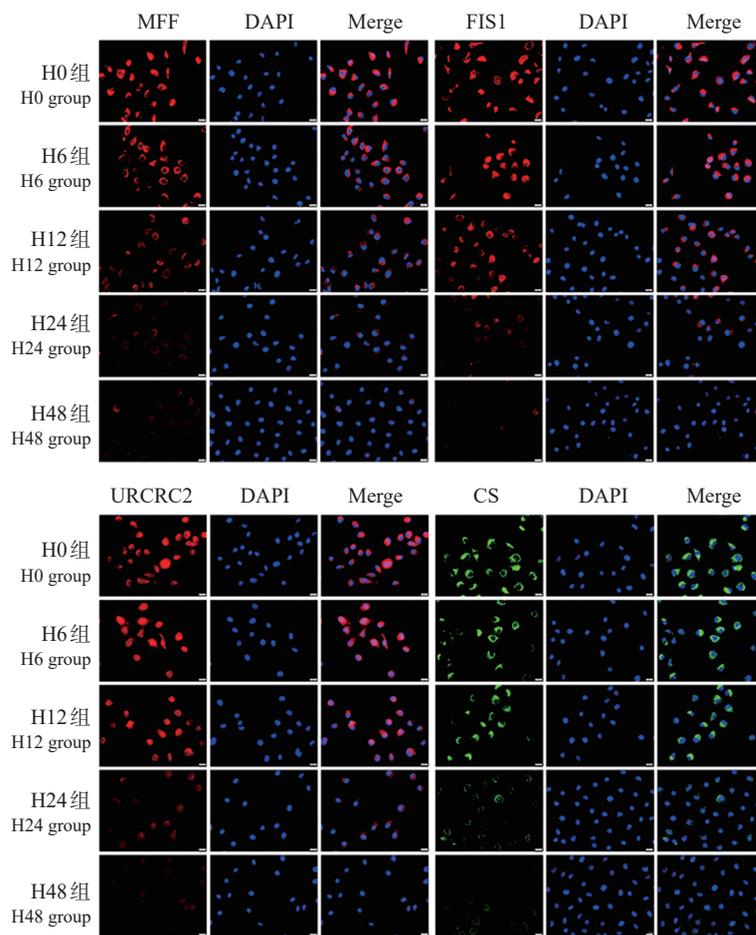


图3 高氧0、6、12、24、48 h时BEAS-2B细胞MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白表达情况(荧光显微镜, ×400) 与H0组相比, H24组和H48组MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白荧光强度降低。

表2 BEAS-2B细胞在高氧0、6、12、24、48 h时MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	MFF	FIS1	CS	UQCRC2
H0组	79.0 ± 1.0	70.0 ± 1.0	62.0 ± 1.0	72.3 ± 1.5
H6组	78.3 ± 2.1	69.0 ± 1.0	62.3 ± 6.1	71.3 ± 2.1
H12组	67.3 ± 4.2 ^{a,b}	58.7 ± 4.0 ^{a,b}	58.7 ± 8.4	65.0 ± 2.7
H24组	32.0 ± 4.4 ^{a,b,c}	29.3 ± 4.9 ^{a,b,c}	34.3 ± 3.2 ^{a,b,c}	45.3 ± 8.3 ^{a,b,c}
H48组	34.0 ± 2.7 ^{a,b,c}	27.0 ± 2.0 ^{a,b,c}	26.3 ± 3.5 ^{a,b,c}	31.3 ± 4.7 ^{a,b,c,d}
F值	169.02	143.76	33.37	46.26
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: [MFF] 线粒体分裂因子; [FIS1] 线粒体裂变蛋白1; [CS] 柠檬酸合酶; [UQCRC2] 泛醇-细胞色素c还原酶复合体核心蛋白2; [H0] 高氧0 h; [H6] 高氧6 h; [H12] 高氧12 h; [H24] 高氧24 h; [H48] 高氧48 h。a示与H0组比较, $P < 0.05$; b示与H6组比较, $P < 0.05$; c示与H12组比较, $P < 0.05$; d示与H24组比较, $P < 0.05$ 。

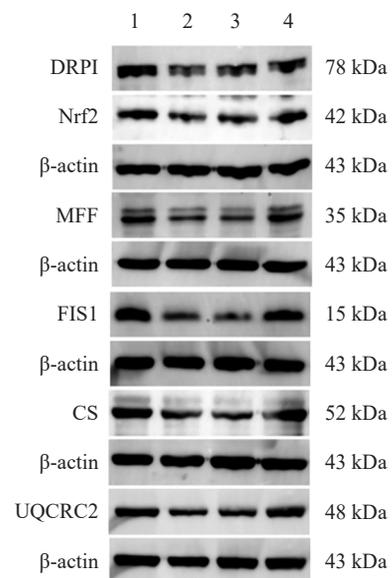


图4 SIRT1抑制剂和激动剂干预后各组细胞Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS和UQCRC2蛋白表达条带图 1: 对照组; 2: H48组; 3: H48+EX 527组; 4: H48+SRT1720组。

表 3 SIRT1 抑制剂和激动剂干预后各组细胞 Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS 和 UQCRC2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Nrf2	DRP1	MFF	FIS1	CS	UQCRC2
对照组	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.03
H48 组	0.44 ± 0.14 ^a	0.61 ± 0.05 ^a	0.46 ± 0.24 ^a	0.46 ± 0.16 ^a	0.52 ± 0.23 ^a	0.49 ± 0.16 ^a
H48+EX 527 组	0.46 ± 0.08 ^a	0.60 ± 0.04 ^a	0.42 ± 0.19 ^a	0.43 ± 0.09 ^a	0.46 ± 0.04 ^a	0.47 ± 0.25 ^a
H48+SRT1720 组	0.79 ± 0.12 ^{b,c}	0.85 ± 0.05 ^{b,c}	0.95 ± 0.08 ^{b,c}	0.99 ± 0.20 ^{b,c}	1.18 ± 0.23 ^{b,c}	0.94 ± 0.14 ^{b,c}
<i>F</i> 值	16.47	19.53	8.55	8.87	11.83	9.08
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	0.007	0.006	0.003	0.006

注：[Nrf2] 核呼吸因子 2；[DRP1] 动力相关蛋白 1；[MFF] 线粒体分裂因子；[FIS1] 线粒体裂变蛋白 1；[CS] 柠檬酸合酶；[UQCRC2] 泛醇-细胞色素 c 还原酶复合体核心蛋白 2；[H48] 高氧 48 h；[H48+EX 527] 高氧 48 h+SIRT1 抑制剂；[H48+SRT1720] 高氧 48 h+SIRT1 激动剂。a 示与对照组比较， $P < 0.05$ ；b 示与 H48 组比较， $P < 0.05$ ；c 示与 H48+EX 527 组比较， $P < 0.05$ 。

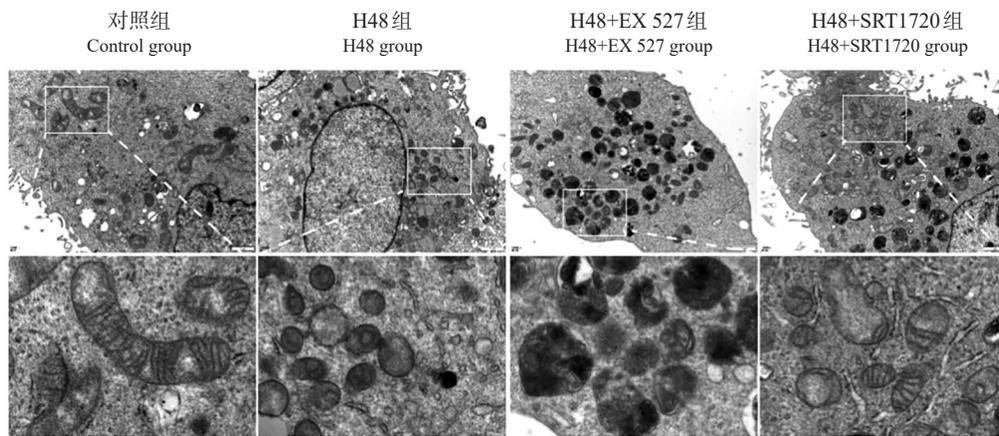


图 5 SIRT1 抑制剂和激动剂干预后各组细胞线粒体形态的透射电镜图 ($\times 12\,000$) 对照组线粒体为长条形，可见线粒体嵴；H48 组和 H48+EX 527 组线粒体变小而圆，线粒体嵴消失；H48+SRT1720 组线粒体形态和线粒体嵴部分恢复。

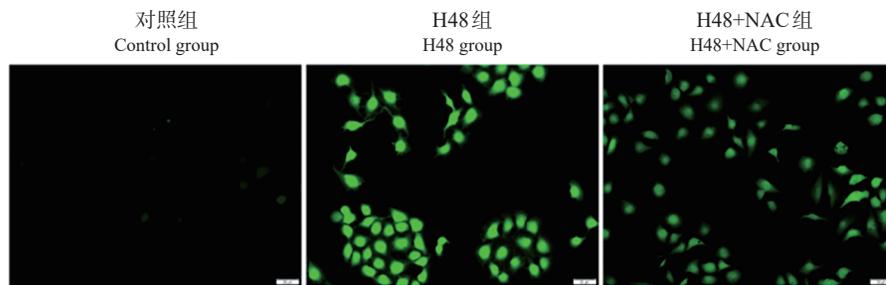


图 6 NAC 干预后各组细胞 ROS 水平 (荧光显微镜, $\times 200$) 绿色荧光代表 ROS 水平, 颜色越深代表 ROS 水平越高。H48 组 ROS 水平高于对照组, H48+NAC 组 ROS 水平低于 H48 组。

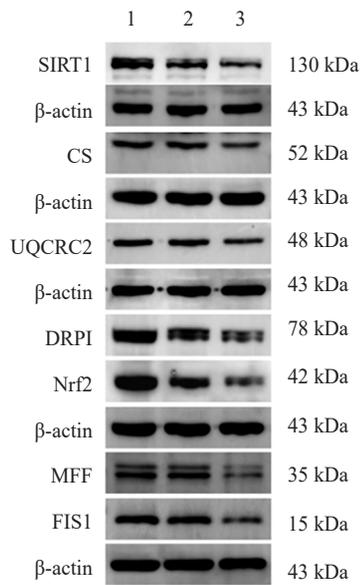


图 7 NAC 干预后各组细胞 SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS 和 UQCRC2 蛋白表达条带图 1: 对照组; 2: H48+NAC 组; 3: H48 组。

2.8 NAC 干预后各组细胞线粒体形态比较

与对照组 [(1.36 ± 0.10) μm²] 比较, H48 组 [(0.43 ± 0.04) μm²] 线粒体平均面积降低 (P < 0.001); H48+NAC 组 [(1.13 ± 0.09) μm²] 线粒体平均面积较 H48 组增加 (P < 0.001)。与对照组 (1.76 ± 0.08) 比较, H48 组 (1.53 ± 0.05) 线粒体平均长宽比降低 (P = 0.002); H48+NAC 组 (1.66 ± 0.02) 线粒体平均长宽比较 H48 组增加 (P = 0.023)。见图 8。

表 4 NAC 干预后各组细胞 SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS 和 UQCRC2 蛋白表达水平比较 (x̄ ± s, n=3)

组别	SIRT1	Nrf2	DRP1	MFF	FIS1	CS	UQCRC2
对照组	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.18	1.000 ± 0.023	1.00 ± 0.05	1.000 ± 0.097	1.000 ± 0.083	1.00 ± 0.05
H48 组	0.50 ± 0.04 ^a	0.37 ± 0.05 ^a	0.541 ± 0.090 ^a	0.60 ± 0.12 ^a	0.508 ± 0.082 ^a	0.566 ± 0.010 ^a	0.61 ± 0.04 ^a
H48+NAC 组	0.81 ± 0.05 ^b	0.66 ± 0.07 ^b	0.770 ± 0.106 ^b	1.02 ± 0.13 ^b	0.909 ± 0.146 ^b	0.792 ± 0.060 ^b	0.85 ± 0.07 ^b
F 值	13.43	22.79	23.85	15.10	16.41	39.65	38.26
P 值	0.006	0.002	0.001	0.005	0.004	<0.001	<0.001

注: [SIRT1] 沉默信息调节因子 1; [Nrf2] 核呼吸因子 2; [DRP1] 动力相关蛋白 1; [MFF] 线粒体分裂因子; [FIS1] 线粒体裂变蛋白 1; [CS] 柠檬酸合酶; [UQCRC2] 泛醇-细胞色素 c 还原酶复合体核心蛋白 2; [H48] 高氧 48 h; [H48+NAC] 高氧 48 h+乙酰半胱氨酸。a 示与对照组比较, P < 0.05; b 示与 H48 组比较, P < 0.05。

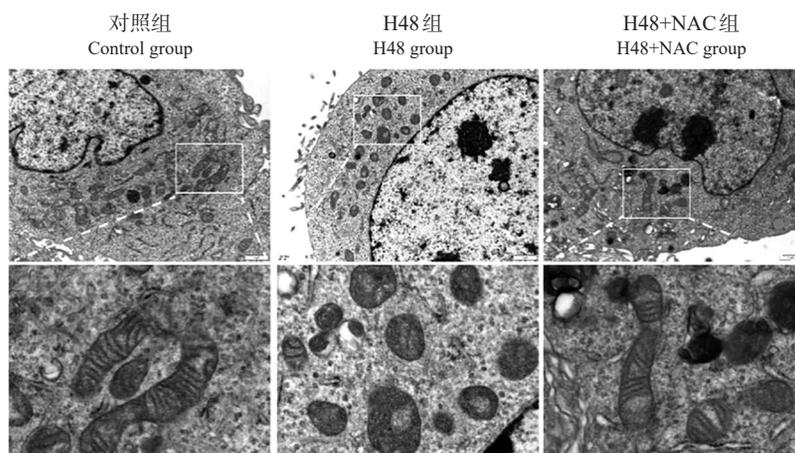


图 8 NAC 干预后各组细胞线粒体形态的透射电镜图 (× 12000) 对照组线粒体为长条形, 可见线粒体嵴; H48 组线粒体变小而圆, 线粒体嵴消失; H48+NAC 组线粒体形态和线粒体嵴部分恢复。

3 讨论

BPD 是一种“氧自由基病”^[14]，研究表明在小鼠肺发育关键时期，不同浓度的氧暴露可以诱导肺泡简化^[15]。同样，新生大鼠暴露在高氧环境下也会出现肺泡简化和肺血管稀疏^[16]。临床研究表明 BPD 患儿出生时具有更高的氧化应激水平^[17]。本研究显示 BEAS-2B 细胞 ROS 随着高氧暴露时间延长而增加，说明高氧激活了氧化应激。

本研究结果显示，高氧 48 h 时细胞中 Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS 和 UQCRC2 蛋白水平均降低。Nrf2 是调控线粒体生物发生的关键因子，促进线粒体转录因子 A 的表达，后者是线粒体 DNA 转录和复制所必需的。本研究显示 Nrf2 降低，说明高氧损伤了 BEAS-2B 细胞线粒体生物发生，这与本课题组前期研究结果^[9, 18]一致。UQCRC2 和 CS 的降低也说明高氧损伤了 BEAS-2B 细胞线粒体能量代谢。有研究证实，在肺上皮细胞中高氧抑制线粒体呼吸并减少呼吸链复合体中的电子流来诱导小鼠肺泡简化^[19]。此外，BPD 易感婴儿的血管内皮细胞表现出较低的线粒体耗氧量和更快的质子泄漏^[20]。本研究显示 DRP1、MFF 和 FIS1 降低，说明高氧抑制了 BEAS-2B 细胞线粒体分裂。有研究发现高氧通过增加 DRP1 参与诱导肺内皮细胞线粒体碎裂^[21]。相反，抑制 DRP1 的表达可改善高氧诱导的肺血管损伤^[22]。推测原因可能是研究对象以及高氧暴露时间的不同。线粒体分裂在 BPD 中的作用仍需进一步研究。

SIRT1 是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的去乙酰化酶，它参与细胞凋亡、炎症、线粒体功能和氧化应激等多个细胞生物学过程^[23]。本研究显示，在高氧 24 h 和 48 h 时 SIRT1 表达降低，提示 SIRT1 是 BPD 的一个保护因子。然而，SIRT1 与高氧诱导的线粒体损伤之间的关系尚不清楚。因此本研究利用 SIRT1 抑制剂和激动剂探讨了 SIRT1 在高氧诱导的 BEAS-2B 细胞损伤中的作用。通过相关文献选择 SIRT1 抑制剂和 SIRT1 激动剂的工作浓度分别为 10 μmol/L 和 2 μmol/L^[24]。本研究结果显示 SIRT1 激动剂逆转了高氧诱导的 Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS 和 UQCRC2 蛋白表达降低，并改善了线粒体形态损伤，提示 SIRT1 通过改善线粒体功能减轻高氧诱导的 BEAS-2B 细胞损伤。有研究发现 SIRT1 通过抑制炎症反应可减轻高氧诱导的肺微血管内皮细胞损伤^[25]。动物研究表明激活 SIRT1 可减轻小鼠肺泡简化、血管渗漏和肺炎症^[26]。事

实上，SIRT1 及其相关信号通路涉及线粒体生物发生、自噬、凋亡、炎症和纤维化等多种生物学过程，这些信号通路与 BPD 的发生发展密切相关^[27]。

本研究通过使用 NAC 证明 ROS 是抑制 SIRT1 表达的关键因素。通过文献选择 NAC 的工作浓度为 5 mM^[28]。本研究结果显示，NAC 可减轻高氧诱导的 ROS 增加，逆转 SIRT1、Nrf2、DRP1、MFF、FIS1、CS 和 UQCRC2 蛋白表达降低，并改善线粒体形态损伤，说明抑制 ROS 可逆转高氧诱导的 SIRT1 降低，从而减轻 BEAS-2B 细胞线粒体损伤。

综上所述，高氧通过 ROS/SIRT1 轴诱导线粒体损伤可能参与了 BPD 的发病机制，SIRT1 可能为 BPD 的潜在治疗靶点，需进一步研究了解其具体机制。

作者贡献声明：董文斌、雷小平、康兰和杨坤负责研究设计并确定实验方案；杨坤、章容和吴越培养细胞、造模；章容查阅文献；杨坤负责 ROS 检测、免疫荧光检测、Western blot 检测和透射电镜检测；吴越参与 Western blot 检测；章容和吴越负责收集本研究数据并进行统计分析；杨坤撰写论文初稿；杨坤、章容和吴越修改论文初稿；董文斌、雷小平和康兰审阅论文初稿。

利益冲突声明：所有作者声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Schmidt AR, Ramamoorthy C. Bronchopulmonary dysplasia[J]. Paediatr Anaesth, 2022, 32(2): 174-180. PMID: 34877749. DOI: 10.1111/pan.14365.
- [2] Shukla VV, Ambalavanan N. Recent advances in bronchopulmonary dysplasia[J]. Indian J Pediatr, 2021, 88(7): 690-695. PMID: 34018135. DOI: 10.1007/s12098-021-03766-w.
- [3] Homan TD, Nayak RP. Short- and long-term complications of bronchopulmonary dysplasia[J]. Respir Care, 2021, 66(10): 1618-1629. PMID: 34552015. DOI: 10.4187/respcare.08401.
- [4] Hwang JS, Rehan VK. Recent advances in bronchopulmonary dysplasia: pathophysiology, prevention, and treatment[J]. Lung, 2018, 196(2): 129-138. PMID: 29374791. PMID: PMC5856637. DOI: 10.1007/s00408-018-0084-z.
- [5] Wang J, Dong W. Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia[J]. Gene, 2018, 678: 177-183. PMID: 30098433. DOI: 10.1016/j.gene.2018.08.031.
- [6] Jhaveri Sanghvi U, Wright CJ, Hernandez TL. Pulmonary resilience: moderating the association between oxygen exposure and pulmonary outcomes in extremely preterm newborns[J].

- Neonatology, 2022, 119(4): 433-442. PMID: 35551136. PMCID: PMC9296587. DOI: [10.1159/000524438](https://doi.org/10.1159/000524438).
- [7] Simon-Szabo Z, Fogarasi E, Nemes-Nagy E, et al. Oxidative stress and peripartum outcomes (review) [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 771. PMID: 34055070. PMCID: PMC8145513. DOI: [10.3892/etm.2021.10203](https://doi.org/10.3892/etm.2021.10203).
- [8] Ten VS, Ratner V. Mitochondrial bioenergetics and pulmonary dysfunction: current progress and future directions[J]. *Paediatr Respir Rev*, 2020, 34: 37-45. PMID: 31060947. PMCID: PMC6790157. DOI: [10.1016/j.prrv.2019.04.001](https://doi.org/10.1016/j.prrv.2019.04.001).
- [9] Yang K, Yang M, Shen Y, et al. Resveratrol attenuates hyperoxia lung injury in neonatal rats by activating *SIRT1*/PGC-1 α signaling pathway[J]. *Am J Perinatol*, 2024, 41(8): 1039-1049. PMID: 35240708. DOI: [10.1055/a-1787-3396](https://doi.org/10.1055/a-1787-3396).
- [10] Adebayo M, Singh S, Singh AP, et al. Mitochondrial fusion and fission: the fine-tune balance for cellular homeostasis[J]. *FASEB J*, 2021, 35(6): e21620. PMID: 34048084. PMCID: PMC8415099. DOI: [10.1096/fj.202100067R](https://doi.org/10.1096/fj.202100067R).
- [11] Yang Y, Liu Y, Wang Y, et al. Regulation of *SIRT1* and its roles in inflammation[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 831168. PMID: 35359990. PMCID: PMC8962665. DOI: [10.3389/fimmu.2022.831168](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.831168).
- [12] Yang X, Dong WB, Lei XP, et al. Resveratrol suppresses hyperoxia-induced nucleocytoplasmic shuttling of *SIRT1* and ROS production in PBMC from preterm infants *in vitro*[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018, 31(9): 1142-1150. PMID: 28420272. DOI: [10.1080/14767058.2017.1311310](https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1311310).
- [13] 汪璠, 雷小平, 康兰, 等. 高氧抑制 *SIRT1* 和 PGC-1 α 表达引起肺泡上皮细胞线粒体功能障碍[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(9): 788-793. DOI: [10.13423/j.cnki.cjemi.009064](https://doi.org/10.13423/j.cnki.cjemi.009064).
- [14] Kimble A, Robbins ME, Perez M. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: role of oxidative stress from 'omics' studies[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(12): 2380. PMID: 36552588. PMCID: PMC9774798. DOI: [10.3390/antiox11122380](https://doi.org/10.3390/antiox11122380).
- [15] Nardiello C, Mižiková I, Silva DM, et al. Standardisation of oxygen exposure in the development of mouse models for bronchopulmonary dysplasia[J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(2): 185-196. PMID: 28067624. PMCID: PMC5312005. DOI: [10.1242/dmm.027086](https://doi.org/10.1242/dmm.027086).
- [16] Greco F, Wiegert S, Baumann P, et al. Hyperoxia-induced lung structure-function relation, vessel rarefaction, and cardiac hypertrophy in an infant rat model[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 91. PMID: 30885241. PMCID: PMC6423834. DOI: [10.1186/s12967-019-1843-1](https://doi.org/10.1186/s12967-019-1843-1).
- [17] Demirtas MS, Kilicbay F, Erdal H, et al. Oxidative stress levels and dynamic thiol-disulfide balance in preterm newborns with bronchopulmonary dysplasia[J]. *Lab Med*, 2023, 54(6): 587-592. PMID: 36896684. DOI: [10.1093/labmed/lmad010](https://doi.org/10.1093/labmed/lmad010).
- [18] Yang M, Shen Y, Zhao S, et al. Protective effect of resveratrol on mitochondrial biogenesis during hyperoxia-induced brain injury in neonatal pups[J]. *BMC Neurosci*, 2023, 24(1): 27. PMID: 37098490. PMCID: PMC10127954. DOI: [10.1186/s12868-023-00797-1](https://doi.org/10.1186/s12868-023-00797-1).
- [19] Garcia D, Carr JF, Chan F, et al. Short exposure to hyperoxia causes cultured lung epithelial cell mitochondrial dysregulation and alveolar simplification in mice[J]. *Pediatr Res*, 2021, 90(1): 58-65. PMID: 33144707. PMCID: PMC8089115. DOI: [10.1038/s41390-020-01224-5](https://doi.org/10.1038/s41390-020-01224-5).
- [20] Kandasamy J, Olave N, Ballinger SW, et al. Vascular endothelial mitochondrial function predicts death or pulmonary outcomes in preterm infants[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(8): 1040-1049. PMID: 28485984. PMCID: PMC5649986. DOI: [10.1164/rccm.201702-0353OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201702-0353OC).
- [21] Ma C, Beyer AM, Durand M, et al. Hyperoxia causes mitochondrial fragmentation in pulmonary endothelial cells by increasing expression of pro-fission proteins[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(3): 622-635. PMID: 29419407. PMCID: PMC5823793. DOI: [10.1161/ATVBAHA.117.310605](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310605).
- [22] Dai Y, Yu B, Ai D, et al. Mitochondrial fission-mediated lung development in newborn rats with hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia with pulmonary hypertension[J]. *Front Pediatr*, 2020, 8: 619853. PMID: 33634054. PMCID: PMC7902063. DOI: [10.3389/fped.2020.619853](https://doi.org/10.3389/fped.2020.619853).
- [23] Chen C, Zhou M, Ge Y, et al. *SIRT1* and aging related signaling pathways[J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 187: 111215. PMID: 32084459. DOI: [10.1016/j.mad.2020.111215](https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111215).
- [24] Zhu X, Wang F, Lei X, et al. Resveratrol alleviates alveolar epithelial cell injury induced by hyperoxia by reducing apoptosis and mitochondrial dysfunction[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(5): 596-606. PMID: 33215523. PMCID: PMC7934147. DOI: [10.1177/1535370220975106](https://doi.org/10.1177/1535370220975106).
- [25] Hong CY, Zhang HD, Liu XY, et al. Attenuation of hyperoxic acute lung injury by *Lycium barbarum* polysaccharide via inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(10): 902-908. PMID: 31388826. DOI: [10.1007/s12272-019-01175-4](https://doi.org/10.1007/s12272-019-01175-4).
- [26] Liang Z, Yue H, Xu C, et al. Protectin DX relieve hyperoxia-induced lung injury by protecting pulmonary endothelial glycocalyx[J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 421-431. PMID: 36755970. PMCID: PMC9900492. DOI: [10.2147/JIR.S391765](https://doi.org/10.2147/JIR.S391765).
- [27] Yang K, Dong W. *SIRT1*-related signaling pathways and their association with bronchopulmonary dysplasia[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 595634. PMID: 33693011. PMCID: PMC7937618. DOI: [10.3389/fmed.2021.595634](https://doi.org/10.3389/fmed.2021.595634).
- [28] Yang J, Li H, Zhang C, et al. Indoxyl sulfate reduces $I_{\text{ox}}/I_{\text{red}}$ by activating ROS/MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. *JCI insight*, 2022, 7(3): e145475. PMID: 35132967. PMCID: PMC8855797. DOI: [10.1172/jci.insight.145475](https://doi.org/10.1172/jci.insight.145475).

(本文编辑: 杨丹)

(版权所有©2024 中国当代儿科杂志)